

암육종과 악성 혼합상피종양에서의 클론형성능에 대한 연구

박은정 · 최유덕 · 남종희 · 이민철
박창수 · 정상우 · 최인선 · 김경희
최찬

전남대학교 의과대학 병리학교실
전남대학교 의과학연구소
전남대학교병원 조혈계질환 유전체연구센터

접 수 : 2002년 5월 13일
게재승인 : 2002년 8월 2일

책임저자 : 최 찬
우 501-746 광주광역시 동구 학1동 5
전남대학교 의과대학 병리학교실
전화: 062-232-1246
Fax: 062-227-3429
E-mail: cchoi@chonnam.ac.kr

*본 연구는 보건 복지부 보건의료기술진흥
사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-
PJ10-PG6-01GN16-0005)

Clonality Study in Carcinosarcomas and Malignant Mixed Epithelial Tumors

Eun Jung Park, Yoo Duk Choi, Jong Hee Nam, Min Cheol Lee, Chang Soo Park
Sang Woo Juhng, In Seon Choi, Kyung Hee Kim and Chan Choi

Department of Pathology, Chonnam National University Medical School, Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences, Genome Research Center for Hematopoietic Diseases, Chonnam National University Hospital, Gwangju, Korea

Background : Tumors are usually considered to be clonal progeny of single transformed cells. Carcinosarcomas and malignant mixed epithelial tumors are examples where controversies exist regarding the singularity or multiplicity of their cell of origin. **Methods :** The authors examined the clonality of carcinosarcomas (7 cases) and malignant mixed epithelial tumor (5 cases) in female patients by X-chromosome inactivation as a marker. Each component of the tumors were picked up by the laser capture microscope. The polymorphic exon 1 CAG trinucleotide repeat in the X-linked human androgen receptor (HUMARA) gene was amplified by a polymerase chain reaction before and after treatment of the methylation-sensitive endonuclease *HpaII*. **Results :** Eleven cases were informative for clonality determination. Six out of seven carcinosarcomas and three out of four malignant mixed epithelial tumors revealed the same patterns of X-chromosome inactivation, which suggests that they are monoclonal. In contrast, the patterns of X-chromosome inactivation were different between the two tumor components in each cases of carcinosarcoma and malignant mixed epithelial tumor, indicating that they are of polyclonal origin. **Conclusions :** These observations show that although most of carcinosarcomas and malignant mixed epithelial tumors are of monoclonal origin, some of them are of polyclonal origin. This finding suggests that these tumors are genuinely polyclonal, and that they originated in the neoplastic transformation of more than one somatic cells

Key Words : Mixed tumor, Malignant-Carcinosarcoma-Clone Cells-X Chromosome

조직의 단세포군은 일반적으로 종양성 증식을 의미한다. 따라서 증식성 조직의 클론형성능은 종양발생을 구명하기 위한 방법으로 꾸준히 연구되어 왔다.^{1,2} 조직의 단클론형성능이란, 여러 가지 원인에 의해 변화를 일으킨 하나의 세포의 증식을 의미한다. 대부분의 종양은 단클론형성능이라 생각되고 있으나 암육종이나 악성 혼합상피종양과 같이 한 종양 내에 모양이 다른 여러 종류의 종양이 혼합되어 있는 경우에 있어서 클론형성능에 대해서는 아직도 논란이 있다.³ 암육종의 조직학적 특징은 각기 다른 상피 종양의 부위와 중간엽 종양의 부위를 가지고 있는 것이고, 악성 혼합상피종양은 각기 다른 분화를 보이는 상피 종양의 부위를 보이는 것이 특징이다. 이와 같은 종양의 기원에 대해서는 두 가지 가설이 있다. 첫 번째 가설은 두 개의 세포가 각기

다른 악성 변화를 거쳐서 하나의 종양을 형성하였다는 다클론형성능 가설이고, 두 번째 가설은 하나의 전형발육능 세포가 여러 방향으로 분화하였다는 단클론형성능 가설이다.

이전의 여러 저자들은 면역조직화학 염색,⁴ 조직 배양,^{5,6} 분자병리학적 방법 등 여러 가지 방법으로 이 종양의 기원에 관한 연구를 시행하였다.⁷⁻¹¹ Kitagawa 등¹²은 난소의 샘육종에서 세포주를 이용하여 상피세포에 transforming growth factor (TGF)-beta를 가했을 때 중간엽세포의 형태를 가지게 된다는 것을 증명하여, 난소의 샘육종이 단클론형성능이라고 주장하였다. 이전의 대부분의 분자병리학적 연구들도 암육종이나 악성 혼합상피종양의 기원에 대하여 두 개의 종양 요소가 단세포군이 라고 주장하였다.^{7,8} Thompson 등⁷은 X 염색체 불활성화를 이

용하여 자궁, 유방, 폐, 위장관의 암육종에서 암종 부위와 육종 부위의 클론형성능을 조사하였는데, 여섯 개의 증례가 모두 단클론형성능임을 증명하였다. 그러나 Wada 등⁹은 분자병리학적 방법을 이용하여 자궁의 암육종 중 대부분은 단세포군이지만 일부에서는 여러 세포군임을 증명하였다.

이제 저자들은 암육종과 악성 혼합상피종양에서 클론형성능을 조사하기 위하여 종양의 각기 다른 부위에서 X 염색체의 다형성을 조사하였다. X 염색체의 다형성을 연구하는 방법 중 이형접합의 빈도가 높고 비교적 검색 방법이 단순한 human androgen receptor (HUMARA) 유전자의 다형성을 조사하였다.^{13,14}

재료와 방법

재료

전남대학교병원에서 1998년부터 2001년까지 암육종이나 악성 혼합상피종양으로 진단된 예중에서 여자 환자의 조직 표본 12예를 대상으로 하였다. 이중 4증례는 자궁목에서, 4증례는 자궁의 체부에서, 1예는 유방에서, 1예는 갑상샘에서, 1예는 방광에서, 그리고 마지막 1예는 폐에서 얻어진 조직이었다. 12예 모두에서 각기 다른 종양의 부위는 서로 가까이 근접하고 있었다. 각 환

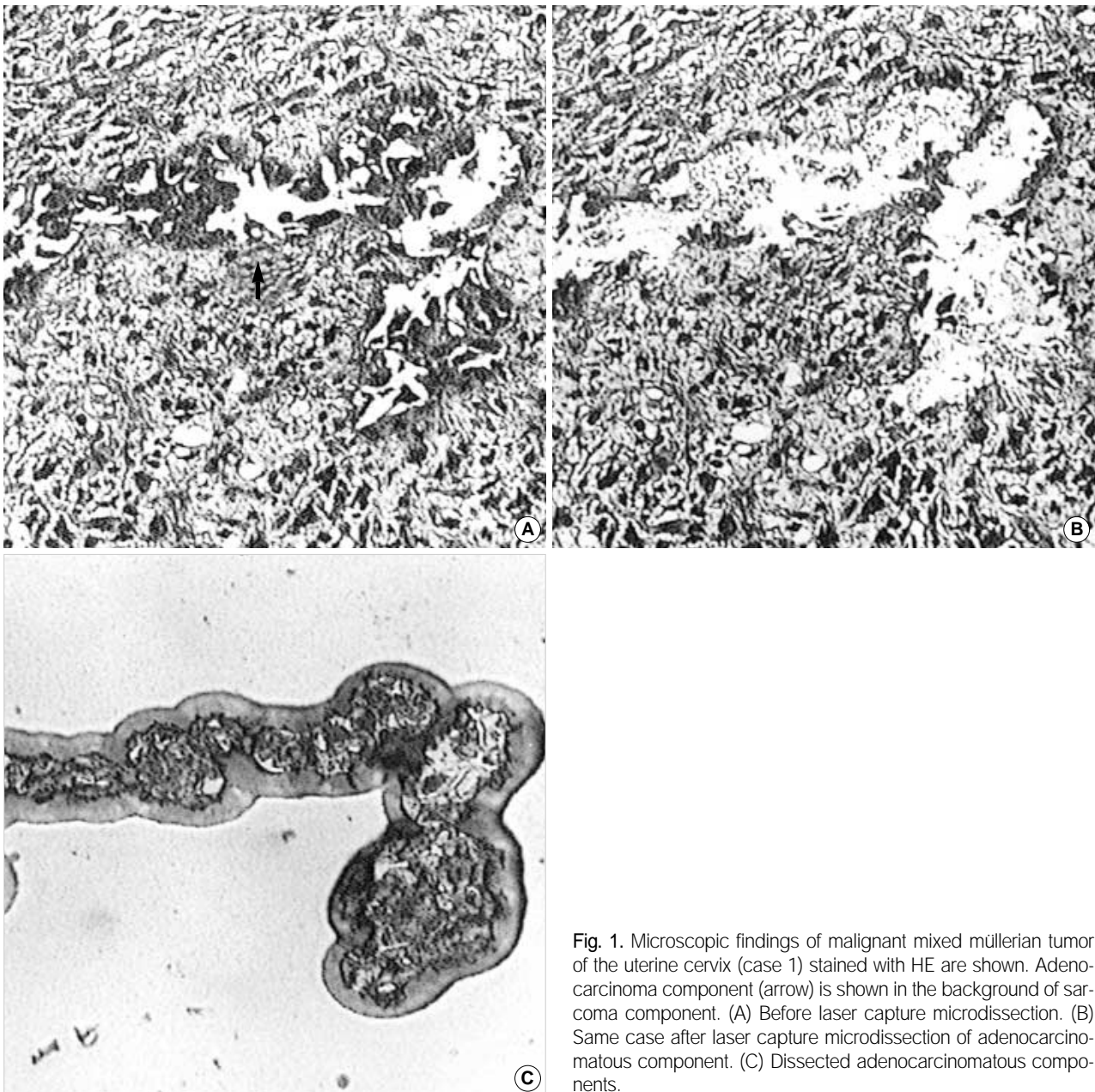


Fig. 1. Microscopic findings of malignant mixed müllerian tumor of the uterine cervix (case 1) stained with HE are shown. Adenocarcinoma component (arrow) is shown in the background of sarcoma component. (A) Before laser capture microdissection. (B) Same case after laser capture microdissection of adenocarcinomatous component. (C) Dissected adenocarcinomatous components.

자의 정상 DNA는 병변이 없는 다른 부위에서 얻어진 조직에서 추출하였다.

DNA 추출

HE 염색 표본을 검토하여 각각의 종양 부위를 구분한 후 파라핀 포매조직에서부터 약 7 μm 두께의 절편을 제작하였다. 절편을 통상의 방법으로 HE 염색을 시행한 후, 봉입하지 않고 약 20분 건조시켜 laser capture microdissection (LCM) system (LM2000, Arcturus Engineering, Mountain View, CA, U.S.A.)을 이용하여 각각의 종양 부위를 채취하였다(Fig. 1). 필름이 피복된 뚜껑(Capsure, Arcturus Engineering)을 사용하였고, 레이저는 7.5 μm 직경에 39-35 mW로 0.7-0.8 ms 동안 사용하였다. 조직을 채취할 때, 현미경으로 미리 슬라이드를 관찰하여 90% 이상 종양 세포만을 얻을 수 있는 부위를 선별하여 조직을 채취하였다. 얻어진 조직에 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 1% Tween-20) 30 μL 와 단백분해효소 K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 6 μL 를 가하고 54°C에서 약 24시간 흔들어 주면서 단백을 분해시켰다. 단백 분해 후, 95°C에서 약 10분간 열을 가하여 proteinase K를 불활성화시키고 이 혼합 용액을 약 5분간 원심분리시킨 다음, 상층액 5 μL 을 취하여 methylation-sensitive restriction enzyme인 *HpaII* (Boehringer-Mannheim) 20U를 가하고 37°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 대조군은 나머지 DNA 중 같은 양 5 μL 에 *HpaII* 대신에 증류수를 넣어 처리하였다.

중합효소연쇄반응

이렇게 LCM의 방법으로 얻어진 DNA는 그 양이 매우 적어 정량이 어려우며, 따라서 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)도 잘 되지 않는 단점이 있다. 따라서 nested PCR을 이용하여 유전자를 증폭하였다.

사람 남성호르몬 수용체 유전자(accession number: M35844)에서 *HpaII*의 절단 부위와 CAG 반복서열을 포함하도록 길잡이들을 제작하였으며, 또 다른 길잡이를 이용하여 nested PCR을 실시하였는데, 그 염기서열은 다음과 같다.

outer sense primer: 5'-AAGGGAAGTAGGTGGAAGAT-3' (M35844, #127-146)

outer antisense primer: 5'-CTCTGGGACGCAACCTCT-3' (M35844, #555-538)

inner sense primer: 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAG-CGTGC-3' (M35844, #230-253)

inner antisense primer: 5'-CTCTGGGACGCAACCTCT-3' (M35844, #508-485)

이 길잡이를 이용하여 중합효소연쇄반응을 하면 *HpaII*에 의해 단절되지 않는 경우, HUMARA 유전자내 CAG의 반복 횟수에 따라 225-315 bp 크기의 중합효소연쇄반응 산물이 생성된다.

먼저 0.2 μL Eppendorf tube에 30 μL 의 중합효소연쇄반응 혼합물 [30 pM, sense와 antisense primers; 250 μM , each dNTP (Promega, Madison, WI); 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.5U Taq polymerase (Finnzymes, Finland), template DNA 4 μL 을 넣어 반응시켰다. 중합효소연쇄반응은 Perkin-Elmer 2400 증폭기를 이용하였으며, denaturation은 94°C에서 5분, annealing은 63°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초씩 25회 반복하였다. 2차 중합효소연쇄반응은 1차 중합효소연쇄반응과 동일한 방법을 이용하였고 1차 중합효소연쇄반응 산물 4 μL 를 template로 이용하였다.

반응 종료 후 중합효소연쇄반응 산물 3 μL 를 동량의 loading buffer와 혼합한 후 6% acrylamide gel에 850 V로 4시간 동안 전기영동하여 은염색법(Promega, Madison, WI, U.S.A.)을 시행하였다.¹⁵

중합효소연쇄반응 결과의 분석

실제 사람의 종양 조직에는 단세포종 종양 조직이라고 하더라도 *HpaII* 처리 전에는 두가지 중합효소연쇄반응 산물이 관찰된다. 종양 세포와 비종양 세포가 섞여 있는 경우에도 *HpaII* 처리 전후에 중합효소연쇄반응을 시행하여 띠(band)의 농도를 비교함으로써 종양 조직의 단클론형성능을 판별할 수 있다. *HpaII* 처리전의 DNA에서는 두 개의 중합효소연쇄반응 산물이 관찰되고, *HpaII* 처리 후의 DNA에서는 한가지의 중합효소연쇄반응 산물만이 관찰되어야 의미있는 증거로 정의하였다.

같은 환자의 종양 조직이라 하더라도 다른 위치에서 남성호르몬 수용체 유전자의 대립유전자가 불활성화 양상을 보인다면, 즉 다른 위치에서 띠가 나타난다면 다른 기원의 종양이라 할 수 있다. 그리고 같은 위치에서 남성호르몬 수용체 유전자의 대립유전자가 불활성화 양상을 보일 때 그 종양이 같은 기원일 가능성은 50%이다.

결 과

연구 대상 12예의 연령, 장기, 병리 조직학적 진단, 그리고 클론형성능 연구결과는 Table 1과 같다. 암육종 7예와 악성혼합상피종양 5예에서 각각의 종양 부위, 그리고 정상 조직에서 추출한 DNA를 이용한 중합효소연쇄반응은 모두 성공적이었다. 11예에서 뚜렷한 2개의 띠를 보였고 각 띠의 농도는 비슷하여 '의의 있음'의 비율은 91.7%였다. 1예는 *HpaII*로 전처리하지 않은 DNA를 이용한 중합효소연쇄반응에서도 뚜렷한 띠 하나와 매우

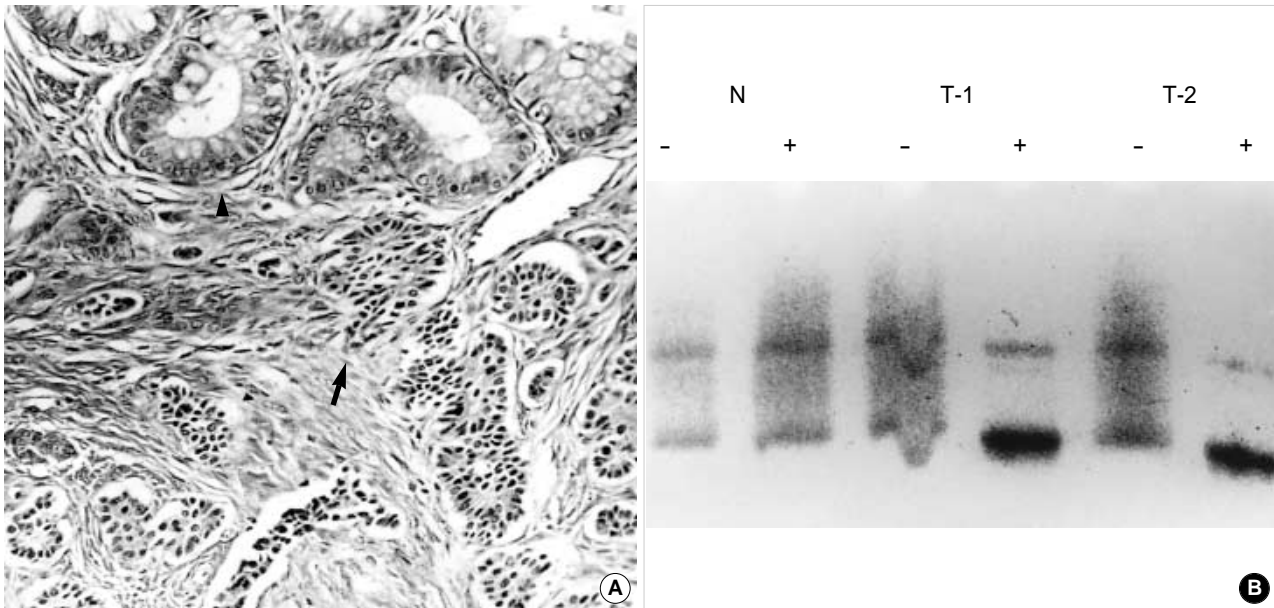


Fig. 2. (A) Microscopic finding of case 9 stained with HE. Small cell carcinoma component (arrow) and adenocarcinoma component (arrow head) of the uterine cervix are shown in this field. (B) Nested PCR product. Tumors from each component show identical patterns of X-chromosome inactivation, consistent with monoclonal origin. DNA extracted from tumor and normal tissues, are digested with (+) or without (-) the HpaII methylation-sensitive restriction enzyme, and amplified by PCR. N=normal tissue; T-1=small cell carcinoma; T-2=adenocarcinoma. PCR: polymerase chain reaction.

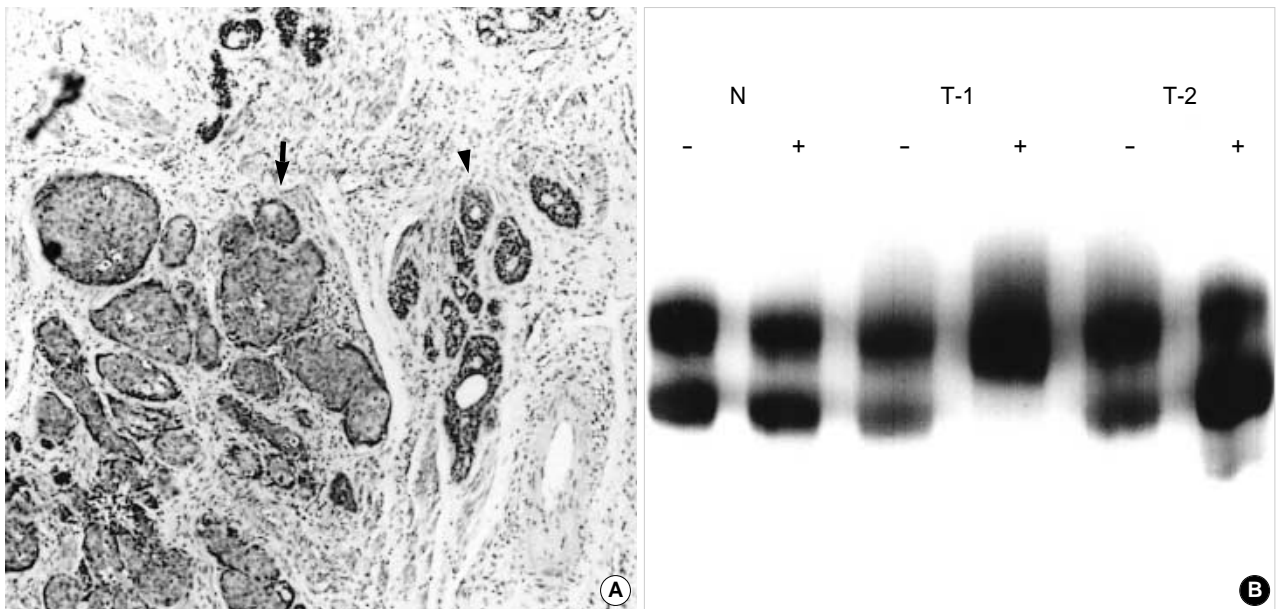


Fig. 3. (A) Microscopic finding of case 11 stained with HE. Carcinoma in situ component (arrow) and adenoid basal cell carcinoma component (arrow head) of the uterine cervix are shown in the same field. (B) Nested PCR product. Tumors from each component show different patterns of X-chromosome inactivation, consistent with independent origin. DNA from tumor and normal tissues, digested with (+) or without (-) the HpaII and amplified by PCR. N=normal tissue; T-1=carcinoma in situ; T-2=adenoid basal cell carcinoma. PCR: polymerase chain reaction.

약한 띠를 보여 동중접합성(homozygosity), 또는 중합효소연쇄 반응 bias로 생각되었으며 '의의 있음'에서 제외하였다.¹⁶

악성 혼합상피종양 4예(증례 9-12) 중 3예(증례 9, 10, 12)

에서는 각각 두 개의 다른 중앙 부위에서 같은 양상의 X 염색체 불활성화가 관찰되었다(Fig. 2). 나머지 1예(증례 11)에서는 다른 양상의 X 염색체 불활성화가 관찰되었다(Fig. 3). 암육종

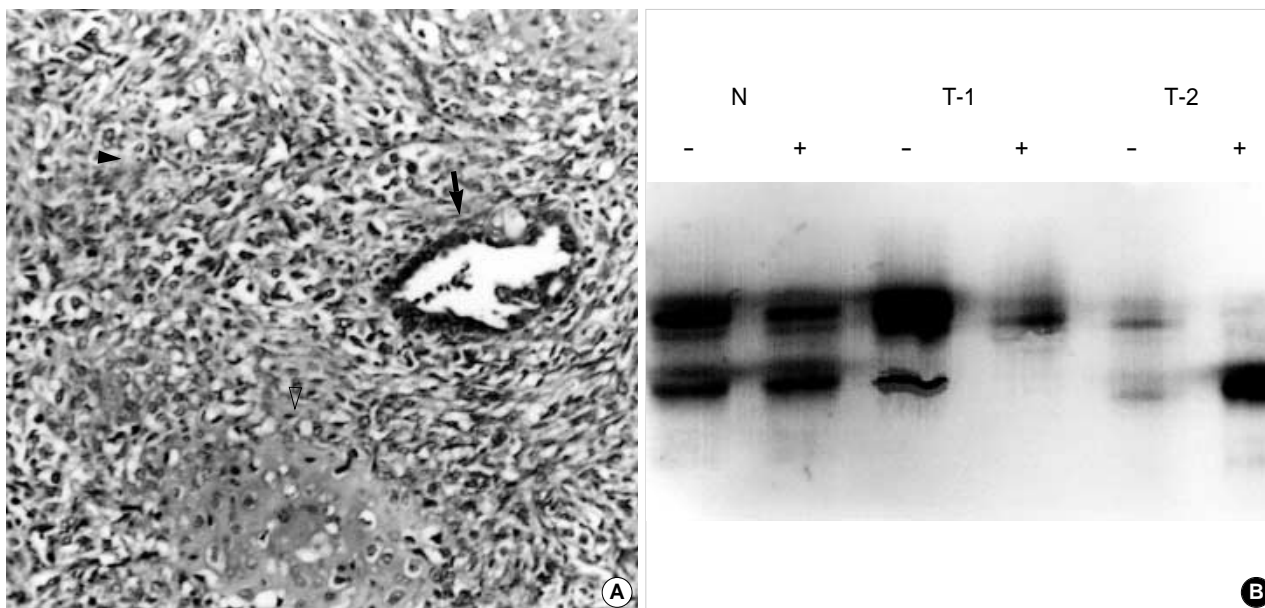


Fig. 4. (A) Microscopic finding of malignant mixed müllerian tumor of the uterine corpus (case 7) stained with HE. Adenocarcinomatous components (arrow) and chondrosarcoma (open arrow head) and malignant fibrous histiocytoma (closed arrow head) components are shown in the same field. (B) Nested PCR product. Tumors from each component show different patterns of X-chromosome inactivation, consistent with independent origin. DNA is prepared from tumor and normal tissues, digested with (+) or without (-) the HpaII methylation-sensitive restriction enzyme, and amplified by PCR. N=normal tissue; T-1=adenocarcinoma; T-2= malignant fibrous histiocytoma. PCR: polymerase chain reaction.

Table 1. Summary of clonality in malignant mixed tumors

Case No	Age	Organ	Diagnosis	X inactivation		Clonality of tumors
				Tumor 1	Tumor 2	
1	70	Uterine corpus	Malignant mixed müllerian tumor	A	A	Monoclonal
2	72	Uterine corpus	Malignant mixed müllerian tumor	A	A	Monoclonal
3	65	Uterine corpus	Malignant mixed müllerian tumor	A	A	Monoclonal
4	65	Lung	Carcinosarcoma	A	A	Monoclonal
5	40	Breast	Metaplastic carcinoma	A	A	Monoclonal
6	68	Urinary bladder	Transitional cell carcinoma and malignant fibrous histiocytoma	A	A	Monoclonal
7	58	Uterine corpus	Malignant mixed müllerian tumor	B	A	Polyclonal
8	41	Uterine cervix	Carcinoma in situ and adenocarcinoma	Not informative		Not determined
9	44	Uterine cervix	Small cell carcinoma and adenocarcinoma	A	A	Monoclonal
10	46	Uterine cervix	Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma	A	A	Monoclonal
11	77	Uterine cervix	Squamous cell carcinoma in situ and adenoid basal cell carcinoma	B	A	Polyclonal
12	52	Thyroid	Papillary carcinoma and follicular carcinoma	A	A	Monoclonal

A. the lower molecular weight of the HUMARA (Human androgen receptor gene) target was inactivated. B. the higher molecular weight of the HUMARA target was inactivated.

7예(증례 1-7) 중 6예(증례 1-6)는 암종 부위와 육종 부위에서 모두 같은 X 염색체가 불활성화되었으며, 1예(증례 7)는 다른 양상으로 X 염색체가 불활성화되었다(Fig. 4).

고찰

정상 여자의 세포핵에 있는 X 염색체는 모성 X 염색체(X_m)

와 부성 X 염색체(X_p)의 2개로 짝지어져 있으며 그 중 하나는 배아기에 불활성화된다.^{17,18} 불활성화는 무작위로 일어나므로 비종양성 조직에는 X_m 또는 X_p가 불활성화되어 있는 세포들이 섞여 있다. 그러나 단세포군 증식을 하는 종양 조직에는 X_m이 불활성화된 세포만이 존재하거나 X_p가 불활성화된 세포만이 존재한다. 따라서 X 염색체의 불활성화 양상으로 클론형성능을 추정할 수 있다. 이런 X 염색체를 이용한 클론형성능을 조사하는 방법으로는 G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase)

의 동종효소를 사용하거나^{1,2}, PGK (phosphoglycerokinase), HPRT (hypoxanthinephosphoribosyl transferase)를 이용할 수 있지만,¹⁹ 이형접합성의 비율(약 30%)이 낮고, DNA가 더 많이 필요하므로 널리 이용하기에는 적합하지 않다.²⁰ 이에 비해 HUMARA 유전자를 이용하는 방법은 이형접합의 비율이 90% 이상이며 파라핀 포매조직에서 추출한 DNA에서도 적용할 수 있으므로 많이 이용되고 있다.^{13,14}

HUMARA 유전자는 Xq11.2-q12에 위치하며,²¹ CAG의 short tandem repeat와 인접한 upstream의 두 군데에 5'-CCGG-3'의 염기서열을 가지고 있다.²² 5'-CCGG-3'은 메틸화에 의해 영향 받는 제한효소 HpaII의 절단 부위이며, 5'-CCGG-3' 염기서열 중 cytosine residue는 X 염색체가 불활성화될 때 메틸화된다. 따라서 불활성화된 X_m 또는 X_p 염색체의 HUMARA 유전자는 HpaII에 의해 절단되지 않으나 활성화 상태에 있는 X_m 또는 X_p 염색체의 HUMARA 유전자는 HpaII에 의해 절단된다.²³ 그러므로 HpaII로 작용시킨 후 HpaII의 절단 부위와 CAG 반복 부위를 포함하도록 primer를 합성하여 중합효소연쇄반응을 실시하면, 불활성화된 HUMARA 유전자의 경우 중합효소연쇄반응 산물이 만들어지나 활성화 상태에 있는 HUMARA 유전자는 중합효소연쇄반응 산물이 만들어지지 않는다. 여러 세포군 조직은 불활성화된 X_m 또는 X_p를 갖는 세포가 섞여 있으므로 HpaII 전처리 후 중합효소연쇄반응을 시행하면 '의의 있음'의 증례는 다른 두 가지 중합효소연쇄반응 산물을 관찰할 수 있으나, 단세포군 조직은 불활성화된 X_m 또는 X_p 하나만을 갖는 세포로 구성되어 있으므로 HpaII 전처리 후 중합효소연쇄반응을 시행하면 한 가지 중합효소연쇄반응 산물을 관찰할 수 있다.

종양의 클론형성능을 조사하기 위해서는 종양 부위만 선택적으로 얻는 것이 중요하다. 저자들은 LCM 기술을 이용하여 종양 세포를 선택적으로 얻었다. 각 종양 부위에서 약 100-400개의 세포들을 얻었고 평균 약 200개의 세포들이 중합효소연쇄반응에 이용되었다.

증례 8에서는 대조군으로 사용한 정상 조직에서도 HpaII로 전처리한 중합효소연쇄반응 산물이 한 개의 띠를 나타냈으므로 결과에서 제외하였다. 나머지 11예는 의의 있는 증례였다. 악성 혼합상피종양 4예 중 3예에서 같은 위치에서 띠가 관찰되었고 이것은 두 종양 부위가 같은 클론에서 기원하였음을 증명하는 소견이다. 악성 혼합상피종양 중, 자궁목에 발생한 샘모양기저암종과 편평상피내암이 동반된 예(증례 11)에서는 서로 다른 위치에서 띠가 관찰되어 각기 다른 기원을 가진 종양임을 알 수 있었다. 7예(증례 1-7)의 암육종에서는 6예(증례 1-6)에서 같은 위치의 띠가 관찰되었고, 자궁체부에 생긴 암육종(증례 7)에서만 다클론형성능이 증명되었다. 자궁체부에 생긴 암육종은 4예에서 관찰되었는데, 이 중 3예는 단클론형성능, 그리고 1예는 다클론형성능을 나타냈고, 이 두 집단 간의 조직학적인 차이는 없었다. 그러나 같은 위치에서 띠가 관찰될 때 이 두 부위가 같은

클론일 가능성은 50%이므로 실제로 다클론형성능의 빈도는 더 증가할 것이라 생각된다. 같은 위치에서 띠가 관찰된 9예가 실제로는 다른 클론일 누적 가능성은 (0.5)⁹, 즉 P값은 0.0002이다.

Wada 등⁹은 25예의 자궁 암육종을 대상으로 HUMARA 유전자의 메틸화 여부와 K-ras 유전자 및 p53 유전자의 돌연변이를 조사하여 이 종양의 클론형성능을 연구하였다. 25예 중 1예는 의의 없는 증례였고, 21예에서는 단클론형성능을 나타냈으며 3예에서는 다클론형성능을 보였다. 일반적으로 종양 발생에 있어서 단세포군 증식은 기본적인 원리로 생각되어왔다. 그러나 암육종이나 악성 혼합상피종양처럼 단세포군 증식만으로 종양의 기원을 설명할 수 없는 경우도 있다. 저자들의 결과는 암육종이나 악성 혼합상피종양의 경우 대부분은 단일 클론형성능이나 일부 증례의 경우는 다클론형성능을 보여, 두 개 이상의 세포에서 동시에 종양성 변화를 일으켰다는 사실을 보여 준다.

참고문헌

- Linder D, Gartler SM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science* 1965; 150: 67-9.
- Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 1976; 458: 283-321.
- Zhuang Z, Lininger RA, Man YG, Albuquerque A, Merino MJ, Tavassoli FA. Identical clonality of both components of mammary carcinosarcoma with differential loss of heterozygosity. *Mod Pathol* 1997; 10: 354-62.
- Ota S, Kato A, Kobayashi H, et al. Monoclonal origin of an esophageal carcinosarcoma producing granulocyte-colony stimulating factor: a case report. *Cancer* 1998; 82: 2102-11.
- Gorai I, Doi C, Minaguchi H. Establishment and characterization of carcinosarcoma cell line of the human uterus. *Cancer* 1993; 71: 775-86.
- Masuda A, Takeda A, Fukami H, Yamada C, Matsuyama M. Characteristics of cell lines established from a mixed mesodermal tumor of the human ovary. *Cancer* 1987; 60: 2696-703.
- Thompson L, Chang B, Barsky SH. Monoclonal origins of malignant mixed tumors (carcinosarcomas). Evidence for a divergent histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 277-85.
- Kersemakers AF, van de Vijver MJ, Fleuren GJ. Comparison of the genetic alterations in two epithelial collision tumors of the uterine cervix. a report of two cases. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 225-30.
- Wada H, Enomoto T, Fujita M, et al. Molecular evidence that most but not all carcinosarcomas of the uterus are combination tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 5379-85.
- Millis JM, Chang B, Zinner MJ, Barsky SH. Malignant mixed tumor (carcinosarcoma) of the pancreas: a case report supporting organ-

- induced differentiation of malignancy. *Surgery* 1994; 115: 132-7.
11. Gotte K, Riedel F, Coy JF, Spahn V, Hormann K. Salivary gland carcinosarcoma: immunohistochemical, molecular genetic and electron microscopic findings. *Oral Oncol* 2000; 36: 360-4.
 12. Kitagawa K, Murata A, Matsuura N, *et al.* Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenosarcoma by transforming growth factor-beta 1. In *J Cancer* 1996; 66: 91-7.
 13. Busque L, Zhu J, Dehart D, Griffith B, Willian C, Carroll R. An expression based clonality assay at the human androgen receptor loces (HUMARA) on chromosome X. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 697-8.
 14. William CL, Busque L, Griffith BB, Favara BE. Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X)-A clonal proliferative disease. *N Engl J Med* 1994; 21: 154-60.
 15. Bassam BJ, Anolles GC, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991; 196: 80-3.
 16. Mutter GL, Boynton KA. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acids Res* 1996; 23: 1411-8.
 17. Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev* 1972; 47: 1-35.
 18. Lyon MF. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1989; 36: 119-30.
 19. Volstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin human tumors. *Science* 1985; 227: 642-5.
 20. Lee PS, Sabbath-Solitare M, Redondo TC, Ongcapin EH. Molecular evidence that the stromal and epithelial cells in pleomorphic adenomas of salivary gland arise from the same origin: clonal analysis using human androgen receptor gene (HUMARA) assay. *Hum Pathol* 2000; 31: 498-503.
 21. Kuiper GG, Faber PW, Van Rooij HC, *et al.* Structural organization of the human androgen receptor gene. *J Mol Endocrinol* 1989; 2: R1-4.
 22. Tilley WD, Marcell M, Wilson JD, Michael JM. Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 327-31.
 23. Allen RC, Zoghbi HY, Moselely AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1229-39.